

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

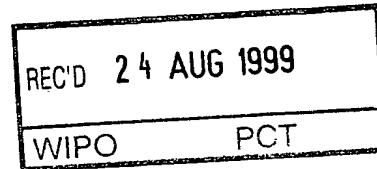
IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE99/1529



**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Bescheinigung**

**09/701066**

Herr Professor Dr. Herbert P. J e n n i s s e n in Essen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Durchfluß-Scheranalysator für biologisch aktive Moleküle  
in Flüssigkeitsschichten auf Oberflächen"

am 25. Mai 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol G 01 N 33/52 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 22. Juli 1999

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Steck

Aktenzeichen: 198 23 301.9

A 9161  
06-90  
11/98

EDV-1



### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen Durchfluß-Scheranalysator mit den Merkmalen des Hauptanspruches zur Messung insbesondere der adsorptionskinetischen Eigenschaften von biologisch aktiven Molekülen an Oberflächen sowie ein Verfahren zur Messung dieser Eigenschaften von biologisch aktiven Molekülen unter Verwendung des Analysators.

Durchfluß-Scheranalysator für biologisch aktive Moleküle in  
Flüssigkeitsschichten auf Oberflächen

Die vorliegende Erfindung betrifft einen

5 Durchfluß-Scheranalysator mit den Merkmalen des Hauptanspruches  
zur Messung insbesondere der adsorptionskinetischen  
Eigenschaften von biologisch aktiven Molekülen an Oberflächen  
sowie ein Verfahren zur Bestimmung dieser Eigenschaften.

10 Das Verhalten von biologisch bedeutsamen Molekülen,  
beispielsweise von Proteinmolekülen, an Oberflächen, ist  
wichtig bei der Beurteilung von Vorgängen in der Biologie,  
Biochemie und bei der Beurteilung von biomedizinischen  
Materialien. Dabei sind die chromatographischen Eigenschaften  
15 der Oberflächen und die Biokompatibilität der Implantate von  
der Bindungsfähigkeit der Proteine an die Oberfläche abhängig.  
Im letzteren Fall kann die Ablagerung von Plasmaproteinen an  
Fremdmaterialien zur Entstehung von Thrombosen und der  
Aktivierung des Komplements führen.

20 Für die direkten Online-Messungen der Adsorption von Proteinen  
an Oberflächen wird im Stand der Technik beispielsweise die  
totale interne Reflektionsfluoreszenz-Technik ("total internal  
reflection fluorescence" - TIRF) verwendet, bei der ausgenutzt  
25 wird, daß ein einfallender Lichtstrahl an einer Grenzschicht  
zwischen einem optisch dichteren Medium (beispielsweise ein  
Feststoff) und einem optisch dünneren Medium (beispielsweise  
einer Flüssigkeit) total reflektiert wird, wenn der  
Einfallswinkel größer als der kritische Winkel für das optisch  
30 dichtere Medium ist. Am Reflektionspunkt im optisch dichteren  
Medium tritt eine Welle der gleichen Frequenz wie die Frequenz  
des einfallenden Lichtes auf. Die Amplitude der Welle nimmt  
exponentiell im optisch dünneren Medium ab. Die  
Durchdringungstiefe dieser in die Untersuchungslösung  
35 austretenden Welle ist im allgemeinen weniger als 200 nm,  
jedoch ausreichend tief, um Fluorophore in der Nähe der  
Grenzfläche anzuregen, wobei eine Anregung des größten Teils

der in der Lösung befindlichen Proteine vermieden wird.

Bei Verwendung einer Anregungswellenlänge von 290 nm ist es möglich, den Tryptophanchromophor in einem Protein selektiv anzuregen, der ein Fluoreszenzmaximum bei 350 nm besitzt. Anderseits ist es auch möglich, über chemische Modifikation einen zusätzlichen Fluorophor in das Protein einzubringen, wobei jedoch die Gefahr der konformationellen Änderungen der Struktur des Proteins besteht.

10

Die gemessene Adsorptionsrate des Proteins an der Oberfläche ohne oder bei nur geringer Strömung hängt von drei unterschiedlichen Schritten ab: 1. dem Massentransport des Proteins in die zwischen Flüssigkeit und Festkörperoberfläche ausgebildete Grenzschicht, 2. der intrinsischen Bindungsgeschwindigkeit und 3. der intrinsischen Dissoziationsgeschwindigkeit. Wenn die Bindungsgeschwindigkeit sehr niedrig ist, wie es bei z.B. sehr niedrigen Oberflächenkonzentrationen der Bindungsstelle für das Protein am Feststoff der Fall ist, wird keine Verarmung an Protein in der Grenzschicht auftreten, und die Adsorptionsgeschwindigkeit wird nur von der intrinsischen Bindungsgeschwindigkeit abhängen.

20

In vielen Fällen ist jedoch die Bindungsgeschwindigkeit höher als die Transportgeschwindigkeit, so daß die Diffusion nicht ausreichend ist, die Konzentration an Protein in der Grenzschicht auf einem bestimmten Niveau zu halten, was die Gesamtreaktion von dem Massentransport abhängig macht. Das bedeutet, daß die Adsorptionsrate beispielsweise stark vom Rühren abhängig ist.

25

Im Stand der Technik wurden einige Lösungsansätze zum Messen der adsorptionskinetischen Daten veröffentlicht, die versuchen, dem Massentransport Rechnung zu tragen. Wenn man jedoch ein direktes kinetisches Signal ohne den störenden Einfluß des Massentransportes erhalten will, muß man die Dicke der nicht

30

gerührten Schichtdicke reduzieren und dies in einem solchen Ausmaß, daß die Adsorptionsrate unabhängig von dem Massentransport durch die Schicht wird. Für das letztgenannte Problem sind im Stand der Technik bis jetzt keine Lösungen vorgeschlagen worden.

Die Aufgabe der Erfindung besteht nun darin, ein Meßsystem und Meßverfahren bereitzustellen, mit dem adsorptionskinetische Meßwerte für biologisch aktive Moleküle ohne den störenden Einfluß des Massentransports gemessen werden können.

Seitens der Erfinder wurde nun überraschend gefunden, daß diese Aufgabe gelöst wird durch Bereitstellung eines Durchfluß-Scheranalysators, mit dessen Hilfe die Adsorptionskinetik von strahlungsfähigen, biologisch aktiven Molekülen an Oberflächen gemessen werden kann, wobei der Durchfluß-Scheranalysator einen Probenkammerblock mit einer darin befindlichen Probenkammer zur Aufnahme von Analysen-, bzw. Pufferlösung, die zumindestens eine Probenkammerwand aus einem strahlungsdurchlässigen Material, beispielsweise einer Quarzplatte, aufweist, mit einer Zuleitung für die Analysen-, bzw. Pufferlösung in die Probenkammer und mit einer Ableitung für die Analysen-, bzw. Pufferlösung aus der Probenkammer und mit einer verschließbaren Injektionsöffnung zum Einbringen einer Probenlösung in die Zuleitung auf der Zuleitungsseite der Probenkammer, und Mittel zur Erzeugung der extrem dünner Flüssigkeitsschichten in der in der Probenkammer befindlichen Analysen-, bzw. Pufferlösung, so daß die Geschwindigkeit der Adsorption der strahlungsfähigen Moleküle an der Oberfläche der strahlungsdurchlässigen Platte nicht durch den Massentransport der Moleküls zu dieser Grenzschicht zwischen Lösung und Oberfläche beeinflußt wird, sowie eine Strahlungsanalyseeinheit für die Leitung und Auswertung der von den biologisch aktiven Molekülen emittierten Strahlung aus, falls erforderlich, einer Strahlungsquelle, einem Strahlungsleiter und einem Strahlungsanalysator, und eine Pumpe zur Zuführung der Pufferlösung über die Zuleitung in die Probenkammer und

gegebenenfalls eine Pumpe zur Abführung der Pufferlösung aus der Probenkammer über die Ableitung umfaßt.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Analysators ist es möglich, in einer extrem dünnen Schichtdicke die Adsorptionskostanten von biologischen aktiven Molekülen wie Proteinen gegenüber Oberflächen zu bestimmen, wobei die Oberflächen mit verschiedenen anorganischen, organischen oder biologischen Materialien mit Hilfe von chemischen oder physikalischen Verfahren oder Kombinationen dieser Verfahren modifiziert sein können, um die Adsorptionscharakteristika entsprechend zu steuern.

Unter biologisch aktiven Molekülen wird erfindungsgemäß jede Art von Molekülen einschließlich monomerer oder polymerer Biomoleküle verstanden, die in irgendeiner Weise eine biologische Aktivität entfalten. So kann es sich bei den biologisch aktiven Verbindungen beispielsweise um Proteine, Pharmazeutika oder andere in irgendeiner Weise in einem Biosystem wirksame Verbindungen handeln. Entscheidend ist allerdings, daß die Verbindungen in jedem Fall die Detektion der von ihnen ausgehenden Strahlung, die beispielsweise durch Anregung des im Molekül vorhandenen Chromophors beispielsweise mit Licht oder durch Markierung des biologisch aktiven Moleküls mit einem radioaktiven Isotop erzeugt wird, ermöglichen. Dabei sollte durch Markieren oder Einbringen eines Chromophors in das biologisch aktive Molekül die Adsorptionscharakteristika möglichst unverändert gegenüber dem nicht markierten Zustand bleiben.

Falls bevorzugt zur Analyse der von den biologisch aktiven Molekülen emittierten Strahlung das TIRF-Verfahren erfindungsgemäß verwendet wird, weist die Strahlungsanalyseeinheit z.B. eine optische Einheit aus einer Lichtquelle, die einen monochromatischen Lichtstrahl liefert, einen Strahlungsleiter, z.B. ein optisches Prisma, und einen Strahlungsanalysator, z.B. einen Emissionsmonochromator mit

angeschlossener Auswertungseinheit auf, wobei das Prisma und die Lichtquelle derart zueinander angeordnet sind, daß der aus der Lichtquelle austretende Lichtstrahl über das auf der lichtdurchlässigen Quarzplatte optisch gekoppelt angeordnete Prisma in einem Winkel der größer als der kritische Winkel für das dichtere Medium ist, auf die Grenzschicht zwischen Quarzplatte und Lösung auftrifft, und das gebildete Fluoreszenzlicht, das an der Grenzschicht zwischen Quarzplatte und Probenflüssigkeit in der Probenkammer erzeugt wird und im wesentlichen lotrecht zur Oberfläche der Quarzplatte austritt, über ein optisches System in den Emissionsmonochromator geleitet wird.

Um die gewünschte dünne Schichtdicke zu erzielen, sind erfindungsgemäß Mittel zur Erzeugung von Scherkräften und Spaltdrucken vorgesehen, die im Inneren der Probenkammer auf die Oberfläche der Quarzplatte wirken. Dabei können diese Scherkräfte erfindungsgemäß mechanisch erzeugt werden. Im einfachsten Fall können die Scherkräfte dadurch erzeugt werden, daß mittels einer zuleitungsseitig angeordneten Vorrichtung Volumeneinheiten in der Größenordnung von 10-100%, vorzugsweise 50%, des Kamervolumens aus einem mit der Pufferlösung nicht mischbaren Fluid in Volumenstromsegmente mit vorzugsweise gleichem Volumen in die Pufferlösung zugespeist werden und so den Volumenstrom der Pufferlösung unterteilen. Vorzugsweise erfolgt die Segmentierung so, daß eine Volumeneinheit des vorgenannten Fluids direkt vor der Zugabe einer Analysenlösung in die durch die Probenkammer geleitete Pufferlösung eingebracht wird und so die Probenkammer freispült, und der Spaltdruck zwischen Fluid und Probenkammerwand dabei eine extrem dünne Flüssigkeitsschicht zwischen 10 und 300 nm erzeugt.

Bei dem Fluid kann es sich beispielsweise um ein Gas oder eine mit der Pufferlösung nicht mischbare Flüssigkeit handeln. Bevorzugt ist die Verwendung von Gas, im einfachsten Fall von Luft. Bei der Verwendung von Gas als nicht mischbarem Fluid

1 kann eine einzelne Gasblase bei Einbringen in die Zuführung je nach Strömungsbedingungen in der Zuleitung in eine Reihe von kleineren Gasblasen nach Art einer "Perlenschnur" zerrissen werden. Ferner ist es bei der Verwendung von Gas als nicht 5 mischbarem Fluid auch möglich, die Schichtdicke zwischen Gasblase und Probenkammerwand in der Probenkammer dadurch zu verringern, daß der Druck unter dem das Gas in die Zuleitung eingebracht wird, erhöht wird. Dabei wird der erfindungsgemäße Durchflußscheranalysator bevorzugt als ein geschlossenes System 10 ausgebildet, d.h. im Leitungssystem des Analysators wird ein gegenüber dem Außendruck erhöhter Druck aufrecht erhalten.

15 Die Zuführung des Fluids zuleitungsseitig in die Zuleitung für die Pufferlösung kann beispielsweise über ein Zweiwegeventil, erfolgen, das jeweils einen Anschluß für die Zuführung der Pufferlösung und das Fluid, sowie eine Abführung des gebildeten Volumenstromes zur Probenkammer aufweist. Die Zuführung des Fluids kann kontinuierlich oder diskontinuierlich erfolgen, wobei bei letzterer Möglichkeit z.B. über die Stellung des 20 Zweiwegeventils zwischen der Zuleitung der Pufferlösung und des Fluids hin und her geschaltet wird.

25 Bei der Probenkammer handelt es sich in der einfachsten Ausführung um eine Durchflußküvette mit einem senkrecht zur Flußrichtung rechteckigen oder kreisförmigen Querschnitt, die in den Probenkammerblock eingesetzt ist und an deren Wandabschnitt die Strahlungsanalyseeinheit, z.B. die optische Einheit zur Leitung und Messung der von den Molekülen emittierten Strahlung angeordnet ist.

30 In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Analysator derart ausgestaltet, daß die Mittel zur Erzeugung der extrem dünner Flüssigkeitsschichten dadurch ausgebildet sind, daß die Probenkammer in Form einer zylindrischen Rheometerkammer zur Aufnahme von Analyse-, bzw. 35 Pufferlösung ausgebildet ist, deren eines Ende von einer lichtdurchlässigen Quarzplatte dicht verschlossen ist, in der

ein zylinderförmiger Rotor, bevorzugt aus einem lichtdurchlässigen Material, drehbar gelagert ist, dessen Außendurchmesser dem Innendurchmesser der Rheometerkammer angepaßt ist, wobei der zylindrische Rotor an der, der 5 Quarzplatte zugewandten Seite kegelförmig ausgebildet ist und die Quarzplatte mit der in der Drehachse des Rotors liegenden Kegelspitze berührt; und die eine Zuleitung und eine Ableitung für die Pufferlösung in die aus Rheometerkammerinnenwänden, 10 Rotorkegel und lichtdurchlässiger Quarzplatte gebildeter Probenkammer, aufweist, und ein Motor zum Antrieb des Rotors vorgesehen ist.

Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Analysators besitzt dabei als wesentliche Bestandteile die Analysatoreinheit und die optische Einheit, die an die Analysatoreinheit gekoppelt ist. Die Analysatoreinheit weist dabei einen Kammerblock mit einer darin befindlichen zylindrischen Rheometerkammer auf, in 15 der ein Rotor aus einem lichtdurchlässigen Material wie beispielsweise Polymethylmethacrylat drehbar gelagert ist, 20 wobei der Außendurchmesser des Rotors dem Innendurchmesser der zylindrischen Analysatorkammer angepaßt ist.

Das Ende der Analysatorkammer ist von einer lichtdurchlässigen festen Platte, z.B. einer Quarzglasplatte, deren Oberfläche chemisch oder physikalisch modifiziert sein kann, verschlossen, wobei der Rotor an der lichtdurchlässigen Quarzplatte 25 zugewandten Seite kegelförmig ausgebildet ist und der Rotor mit der Kegelspitze die lichtdurchlässige Quarzplatte berührt und die eigentliche Analysatorkammer bildet. Der Winkel in der 30 Kegelspitze zur Drehachse (Kegelschräge/Drehachse) beträgt dabei etwa  $85^\circ$  bis  $89.9^\circ$ , vorzugsweise  $89^\circ$ , so daß eine Probenkammer mit einem um die Drehachse des Rotors vorhandenen 35 dreieckigen Radialquerschnitt gebildet wird, wobei der Dreieckswinkel an der Kegelspitze etwa  $0.1^\circ$  bis  $5^\circ$  vorzugsweise  $1^\circ$ , beträgt.

Der Durchmesser der Rheometerkammer, bzw. des Rotors, im

allgemeinen etwa 2-4 cm, ist dabei so aufeinander in Abhängigkeit von dem zuvor genannten Dreieckswinkel bestimmt, daß sich ein Probenkammervolumen von 10 bis zu 1000  $\mu$ l, vorzugsweise 50 bis 150, besonders bevorzugt 100  $\mu$ l ergibt. In die Probenkammer wird eine Pufferlösung über eine Zuleitung ein- und über eine Ableitung abgeleitet, die bevorzugt in der Quarzplatte angeordnet sind. Durch den sich drehenden Konus wird auf der Quarzplatte, auf der das Protein adsorbiert werden soll, ein Scherkraftfeld über die in der Probenkammer befindliche Pufferlösung erzeugt, und es ist entsprechend nach Einbringung der zu untersuchenden, das Protein enthaltenden Lösung möglich, die Adsorption des Proteins an die Oberfläche zu untersuchen und in Abhängigkeit von der Drehzahl des Rotors die kritische Scherrate für das jeweilige Protein zu bestimmen, bei der die Adsorptionsrate des Proteins an der Oberfläche der Quarzplatte unabhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit des Proteins ist.

Dabei ist die Kammer bevorzugt so ausgebildet, daß gleichzeitig d.h. bei Drehung des Rotors das Durchflußvolumen (Kammer mit 1° -Winkel) eine Größe zwischen 1 bis 500 ml pro Stunde, vorzugsweise 150 ml/Std., einnehmen kann. Dieser Volumendurchstrom erzeugt gleichermaßen eine signifikante Scherrate in einer Größenordnung bis zu 10 000 s-1, so daß ein System entsteht, bei dem die Gesamtscherrate als Summe aus der Scherrate des Durchflusses und der Scherrate der Kegelrotation betrachtet werden kann.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des unter Verwendung der Vorrichtung angewandten Verfahrens ist es möglich, die Proteinadsorption unter genau definierten externen Scherkräften zu bestimmen. Die Vorrichtung kann auch verwendet werden, um beispielsweise die Scherbedingungen im Blutstrom *in vivo* während der Proteinabsorption zu simulieren, und die durch den Fluß induzierte Scherung bei adsorptionschromatographischen Säulen für Proteintrennungen zu analysieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Zuleitung und die Ableitung der Pufferlösung in die Probenkammer in einer Einie mit der Kegelspitze auf der Quarzplatte angeordnet, und weiter bevorzugt ist die Zuleitung in der Nähe der Kegelspitze 5 angeordnet. So kann die Untersuchungslösung an der Stelle der Probenkammer eingebracht werden, an der diese die geringste axiale Ausdehnung besitzt (damit die zu durchdringende Schicht bei der Adsorption der Proteine an die ggf. modifizierte Oberfläche der Quarzplatte eine möglichst geringe Dicke 10 aufweist) und so ist eine möglichst geringe Schichtdicke zur Adsorption der Proteine an die ggf. modifizierte Quarzplatte von den Proteinen zu durchdringen.

15 Bevorzugt befindet sich die Injektionsöffnung zur Einbringung der Probenlösung in der Zuleitung der Pufferlösung in die Probenkammer, besonders bevorzugt in der Zuleitung in der Nähe der Quarzplatte an der Stelle, wo Quarzplatte und Zuleitung miteinander verbunden sind. Bei Einbringen der Probenlösung, die die zu untersuchenden Proteine enthält, bevorzugt in der 20 Nähe der Drehachse des Rotors, über die Injektionsöffnung mittels einer Pumpe und Zuleitung in die Probenkammer wird die Probenlösung durch die Pufferlösung verdünnt radial und tangential nach außen bewegt und die in der Lösung enthaltenen Proteine kommen dabei mit der ggf. modifizierten Quarzoberfläche in Kontakt und werden adsorbiert.

25 Von etwa gleich großer Bedeutung wie die Zuführung ist die Ableitung der Pufferlösung aus der Kammer. Die Ableitung der Kammer kann an eine Saugpumpe angeschlossen sein, die aktiv die Flüssigkeit aus der Kammer heraussaugt. Dadurch werden extrem 30 hohe Durchflußraten bis zu 500 ml/Stunde möglich.

Überraschenderweise wurde seitens der Erfinder festgestellt, daß die Empfindlichkeit des Verfahrens weiter dadurch 35 gesteigert werden kann, wenn direkt vor der zu untersuchenden Lösung eine Volumeneinheit in der Größe von 10 bis 100% des Kamervolumens, bevorzugt 50% des Kamervolumens, eines mit der

Untersuchungslösung nicht mischbaren Fluids, das aus einer mit der Untersuchungslösung nicht mischbaren Flüssigkeit oder einer Gasblase, die aus einem unedlen oder einem Edelgas bestehen kann oder beidem nacheinander besteht, in die Rheometerkammer eingebracht wird, um die Adsorptionsoberfläche auf der Quarzplatte zunächst von Fremdstoffen freizuspülen, hauptsächlich aber, um eine extrem dünne Flüssigkeitsschicht von 10-300 nm Dicke auf der Quarzglasoberfläche zu erzeugen.

5

10 Dabei ist besonders bevorzugt, daß das Einbringen des Fluids in die Probenkammer in Form einer Luftblase geschieht, die unmittelbar vor der Probenlösung in die Probenkammer eingebracht wird und die in der Probenkammer vorhandene Pufferlösung zunächst nahezu vollständig verdrängt, so daß eine direkte Benetzung der Adsorptionsoberfläche auf der Quarzplatte mit der zu untersuchenden proteinhaltigen Probenlösung ermöglicht wird. Die Größe des Totvolumens, bzw. der Luftblase beträgt dabei bis zu 1000  $\mu$ l, bevorzugt bis zu 100  $\mu$ l und besonders bevorzugt bis zu 50  $\mu$ l. Die Luftblase wird dann

15

20 durch die Absaugvorrichtung augenblicklich entfernt.

Die vorliegende Erfindung ist daher auch auf ein Verfahren zur Analyse einer Flüssigkeit auf einen in der Flüssigkeit vorhandenen Inhaltsstoff gerichtet, das dadurch gekennzeichnet ist, daß der durch eine Probenanalysekammer zu leitende Flüssigkeitsstrom, der auf den oder die Inhaltsstoffe zu untersuchen ist, vor Eintritt in die Probenanalysekammer durch mit der Flüssigkeit nicht mischbare Volumeneinheiten in Volumenstromsegmente unterteilt wird und so die Probenkammer freigespült wird. Dabei kann der Flüssigkeitsstrom durch Zuführung von Volumeneinheiten aus einer mit der Flüssigkeit nicht mischbaren Flüssigkeit oder Luftblasen oder beidem in Volumenstromsegmente unterteilt werden, so daß eine wiederholte Erzeugung von extrem dünnen Flüssigkeitsschichten auf der Oberfläche bewerkstellt wird. Das ist z.B. bei sehr langsamem Kinetiken in einem niedrigen Konzentrationsbereich notwendig. Dies wird im einfachsten Fall dadurch erreicht, daß der

25

30

35

Flüssigkeitsstrom über ein Zweiwegeventil mit je einer  
Zuführung für den Flüssigkeitsstrom der Pufferlösung und das  
nicht mischbare Fluid und einer gemeinsamen Abführung in  
Richtung der Probenanalysenkammer geleitet wird, wobei während  
5 der Analyse des Flüssigkeitsstromes in der Probenanalysenkammer  
in Intervallen zwischen den beiden Zuführungspositionen am  
Zweiwegeventil intermittierend geschaltet wird. Hierzu wird  
dem Zweiwegeventil sowohl der Flüssigkeitsstrom als auch die  
nicht mischbare Flüssigkeit oder Luft mit Hilfe von Pumpen  
10 zugeführt.

Wenn in der zu untersuchenden Flüssigkeit biologisch aktive  
Moleküle wie z.B. Proteine enthalten sind, können die  
adsorbierten Proteine optisch mit Hilfe eines  
Fluoreszenzspektrophotometers mit einer Anregungswellenlänge  
15 von 290 nm und Emissionswellenlänge von 350 nm nachgewiesen  
werden. Dazu ist auf der Quarzplatte ein Prisma angebracht, das  
mit der Quarzplatte z.B. mittels eines Mediums des gleichen  
Brechungsexponenten, z.B. Glycerin, optisch gekoppelt ist. Dazu  
20 wird ein monochromatischer Lichtstrahl von einer Xenonlampe  
erzeugt, der über einen Anregungsmonochromator geleitet in  
einem nahezu rechten Winkel auf das Prisma auftrifft und mit  
den an der Grenzfläche fest/flüssig adsorbierten Proteinen in  
Wechselwirkung trifft und den (das in diesen als Fluorophor  
25 dienende) im Tryptophan enthaltenen Fluorophor zur Emission von  
Fluoreszenzlicht anregt. Dieses Fluoreszenzlicht tritt in  
einer zur Drehachse des Rotors parallelen Richtung senkrecht  
zur Quarzplatte aus und wird über ein optisches System aus  
Spiegeln und Linsen in einen Emissionsmonochromator geleitet,  
30 der wiederum mit einem Photomultiplier zur Bestimmung der  
Lichtintensität verbunden ist.

Das Fluoreszenzsignal wird aufgezeichnet (in Meßsignalen pro  
Sekunde) CPS in Bezug auf die Fluoreszenz der Pufferkontrolle.  
35 Selbstverständlich können die Zu- und Abführungen auch in der  
Außenwand der Rheometerkammer angeordnet sein, wobei allerdings  
die zuvor beschriebene Anordnung der Zu- und Ableitung in der

25.05.96

12

Quarzplatte in einer Linie mit der Drehachse des Rotors, bzw.  
der Kegelspitze die vorteilhafteste Ausführungsform darstellt.

5 Unter Verwendung des erfindungsgemäßen Rheometers wurden die  
adsorptionskinetischen Eigenschaften beispielhaft von  
Fibrinogen gemessen, und die erhaltenen Ergebnisse sind in den  
Diagrammen 1 und 2 dargestellt.

Diagramm 1

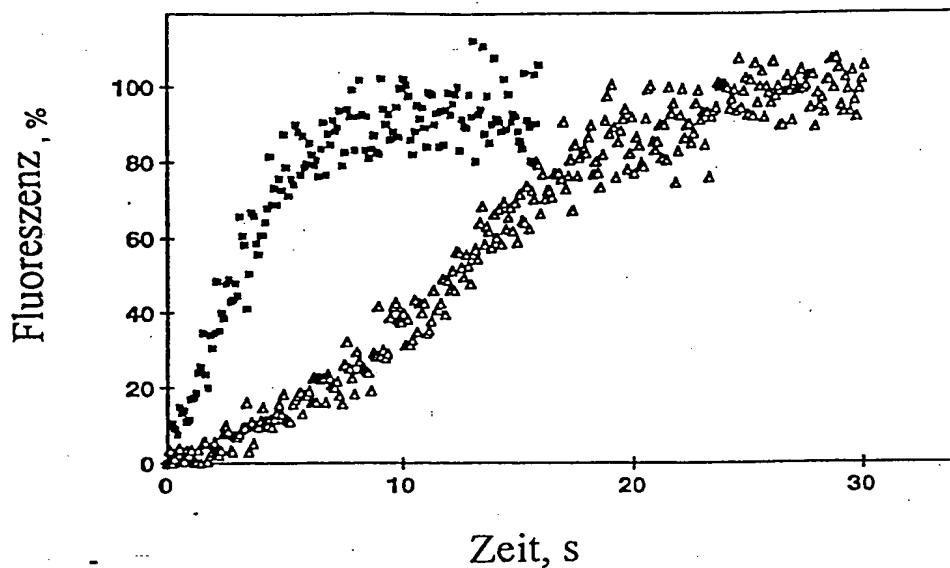
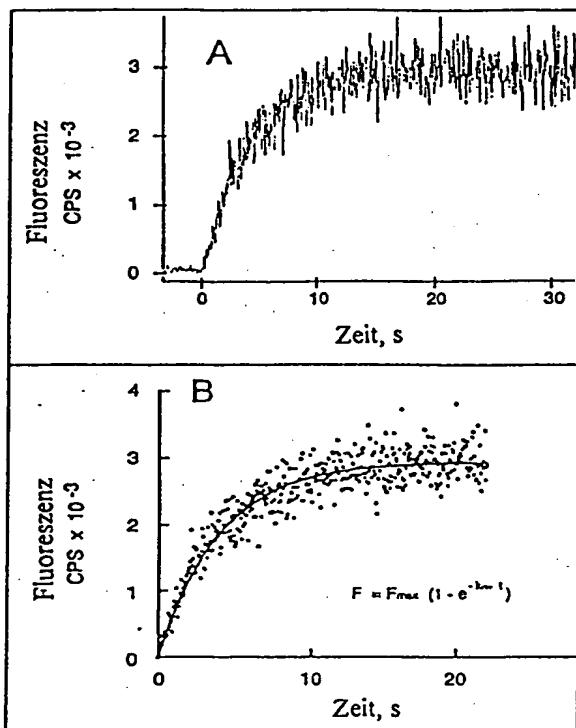


Diagramm 2



20 Dabei zeigt Diagramm 1 den Vergleich der Adsorptionsgeschwindigkeiten von Fibrinogen auf Quarzglas, wobei vor der zu untersuchenden Lösung eine Luftblase von 50  $\mu$ l (geschlossene Quadrate) injiziert wurde, bzw. keine Luftblase (offene Dreiecke) in eine Kammer von 100  $\mu$ l injiziert wurde. Die Proteinkonzentration betrug dabei 100  $\mu$ g/ml, die Durchflußrate 150 ml/Std. und die Scherrate des Rheometers 7200 s<sup>-1</sup>. Wie dem Diagramm 1 zu entnehmen ist, nimmt durch die Vorinjektion einer Luftblase die Halbwertszeit der Adsorption von 12.7 Sekunden (ohne Luftblase) auf 2.6 Sekunden (mit Luftblase) ab.  
25 Ferner verschwindet die Sigmoidität der Kurve zugunsten einer Exponentialfunktion. Die unkorrigierten 100% Werte betrugen 2300 cps ohne und 2000 cps mit Luftblase.  
30

35 Diagramm 2 zeigt die exponentielle Adsorptionskinetik von Fibrinogen auf Quarzglas, die mit der Methode der TIRF-Rheometrie unter Vorinjektion einer Luftblase gemessen wurde. Bei dieser Messung betrug die Proteinkonzentration 188  $\mu$ g/ml,

die Durchflußrate 150 ml/Std. und die Scherrate des Rheometers  $720 \text{ s}^{-1}$ . In der oberen Abbildung A ist die original Online-Aufzeichnung der Kinetik dargestellt. Die nicht-lineare Anpassung der experimentellen 443 Punkte an eine Exponentialfunktion ergab die Werte  $k_{\text{obs}} = 0.261 + 0.006 \text{ s}^{-1}$  [ $k_{\text{obs}} = \text{Anstieg der Exponentialfunktion (observierte Geschwindigkeitskonstante)}$ ], P-Wert der Residuals = 0.138 und  $r^2 = 0.90$ .

10 Im folgenden wird eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Rheometers unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren 1 und 2 beschrieben.

15 Dabei zeigt Figur 1 einen schematischen Längsquerschnitt durch einen erfindungsgemäßen Analysator mit Rheometereinheit in Höhe der Drehachse des Rotors; und Figur 2 den schematischen Aufbau der verwendeten optischen Einheit.

20 Wie in Figur 1 in einem Längsquerschnitt durch die erfindungsgemäße Rheometereinheit gezeigt, ist der drehbare Rotor (1) innerhalb der schematisch angedeuteten Rotorkammerwände (2) drehbar gelagert. Der Rotor berührt mit der Spitze die Quarzplatte (3), die zwischen den Rotorkammerseitenwänden (2) dicht abschließend gehalten wird. In die Probenkammer (4) mündet nahe der Kegelspitze, die die Quarzplatte (3) berührt, der Zufluß (5) und die über den Zufluß (5) zugeführte Flüssigkeit wird über den Abfluß (6) aus der Probenkammer wieder aktiv durch Absaugen entfernt. Bei 25 Rotation des drehbar gelagerten Rotors durch Antrieb des in der Zeichnung nicht dargestellten Motors wirken auf den an der der Probenkammer zugewandten Seite der Quarzplatte haftenden Flüssigkeitsfilm, in dem die in der Figur 1 als schwarze Punkte dargestellten Proteine (7) enthalten sind, wobei bei steigender Drehzahl die Dicke der Flüssigkeitsschicht durch die 30 Scherkräfte reduziert wird.

35 Möglichst in der Nähe der Zuleitung (5) der Pufferlösung, bzw.

der in der Zuleitung der Pufferlösung angeordneten, in der Zeichnung nicht dargestellten Injektionsöffnung für die zu untersuchende Probenlösung ist optisch gekoppelt ein Prisma (8) auf der der Probenkammer abgewandten Seite der Quarzplatte (3) angebracht. Der aus der Lichterzeugungseinheit (9), die hier nur schematisch dargestellt ist, austretende Lichtstrahl wird über das Prisma auf die adsorbierten Proteine gelenkt und regt den in den Proteinen vorhandenen Tryptophanfluorophor zur Erzeugung eines Fluoreszenzlichtes (10) an, das senkrecht in Richtung des Prismas parallel zur Rotationsachse des Rotors (5) austritt und in Richtung des Emissionsmonochromators mit angeschlossener Auswertungseinheit, die in Fig. 1 nicht dargestellt sind, geleitet wird.

15 In Figur 2 ist der Lichtgang des erzeugten monochromatischen Lichts genauer dargestellt. Dabei wird das von der Xenonlampe (11) erzeugte Licht zunächst in monochromatisches Licht umgesetzt, über optische Elemente wie Schlitzraster, Linsen und Spiegel (12) auf das Prisma (8) geleitet und der von der Probe emittierte Fluoreszenzlichtstrahl (10) über Linsen und Spiegel (13) in den Emissionsmonochromator (14) geleitet, der mit einer Photomultiplier verbunden ist und dessen Signale in einer angeschlossenen Recheneinheit (15) ausgewertet werden.

Patentansprüche

1. Durchfluß-Scheranalysator zur Messung der Adsorptionskinetik von strahlungsfähigen Molekülen an Oberflächen, umfassend

5 einen Probenkammerblock

mit einer darin befindlichen Probenkammer zur Aufnahme von Analysen-, bzw. Pufferlösung, die zumindestens eine Probenkammerwand aus einem strahlungsdurchlässigen Material aufweist;

10 mit einer Zuleitung für die Pufferlösung in die Probenkammer und einer Ableitung für die Pufferlösung aus der Probenkammer; und mit einer verschließbaren Injektionsöffnung zum Einbringen einer Probenlösung auf der zuleitungsseite der Probenkammer;

15 Mittel zur Erzeugung von extrem dünnen Flüssigkeitsschichten in der, in der Probenkammer befindlichen Pufferlösung, so daß die Geschwindigkeit der Adsorption der Moleküle an der Oberfläche der strahlungsdurchlässigen Platte nicht durch den Massentransport der Moleküle zu dieser

20 Grenzschicht zwischen Lösung und Oberfläche beeinflußt wird;

eine Strahlungsanalyseeinheit für die Leitung und Auswertung der von den biologisch aktiven Molekülen emittierten Strahlung aus, falls erforderlich, einer Strahlungsquelle, mindestens einem Strahlungsleiter und einem

25 Strahlungsanalysator;

eine Pumpe zur Zuführung der Pufferlösung über die Zuleitung in die Probenkammer; und gegebenenfalls

30 eine Pumpe zur Abführung der Pufferlösung aus der Probenkammer über die Ableitung umfaßt.

2. Analysator nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Strahlungsanalyseeinheit aus einer optischen Einheit aus einer Lichtquelle, die einen monochromatischen Lichtstrahl liefert, einem Strahlungsleiter, vorzugsweise einem optischen Prisma, und einem Strahlungsanalysator, vorzugsweise einem Emissionsmonochromator mit angeschlossener Auswertungseinheit besteht, wobei der Strahlungsleiter und die Lichtquelle derart

zueinander angeordnet sind, daß der aus der Lichtquelle austretende Lichtstrahl über den auf der strahlungsdurchlässigen Probenkammerwand optisch gekoppelt angeordneten Strahlungsleiter in einem Winkel, der größer als 5 der kritische Winkel für das dichtere Medium ist, auf die Grenzschicht zwischen Probenkammerwand und Lösung auftrifft, und das gebildete Fluoreszenzlicht, das an der Grenzschicht zwischen Probenkammerwand und Probenflüssigkeit in der Probenkammer erzeugt wird und im wesentlichen lotrecht zur 10 Oberfläche der Probenkammerwand austritt, über ein optisches System in den Strahlungsanalysator geleitet wird.

15 3. Analysator nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenkammerwand aus einem strahlungsdurchlässigen Material aus einem Quarzglas, vorzugsweise in Form einer Quarzplatte, besteht.

20 4. Analysator nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Strahlungsleiter ein Prisma oder eine Glasleiterfaser ist.

25 5. Analysator nach Anspruch 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Strahlungsanalysator ein Emissionsmonochromator ist.

6.. Analysator nach einem der Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die biologisch aktiven Moleküle Proteine sind.

30 7. Analysator nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die dem Probenkammerinneren zugewandte Seite der Probenkammerwand aus einem strahlungsdurchlässigen Material mit einer die Ankopplung der strahlungsfähigen Moleküle erleichternden Beschichtung versehen ist.

35 8. Analysator nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zur Erzeugung von extrem dünnen

Flüssigkeitsschichten in Form einer zuleitungsseitig angeordneten Vorrichtung ausgebildet sind, die den Volumenstrom der Pufferlösung in der Zuleitung durch Einbringen von mindestens einer Volumeneinheit aus einem mit der Pufferlösung nicht mischbaren Fluid, gewünschtenfalls unter Beaufschlagung mit Druck, in Volumenstromsegmente unterteilt.

5

9. Analysator nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das mit der Pufferlösung nicht mischbare Fluid aus Gas oder einer mit der Pufferlösung nicht mischbaren Flüssigkeit besteht.

10

15

10. Analysator nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenkammer zur Aufnahme von Analysen-, bzw. Pufferlösung in Form einer strahlungsdurchlässigen Durchflußküvette mit einem senkrecht zur Flußrichtung rechteckigen oder kreisförmigen Querschnitt ausgestattet ist.

20

25

11. Analysator nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zur Erzeugung der extrem dünner Flüssigkeitsschichten dadurch ausgebildet sind, daß die Probenkammer in Form einer zylindrischen Rheometerkammer zur Aufnahme von Analysen-, bzw. Pufferlösung ausgebildet ist, deren eines Ende von einer lichtdurchlässigen Quarzplatte dicht verschlossen ist,

30

in der ein zylinderförmiger Rotor aus einem lichtdurchlässigen Material drehbar gelagert ist, dessen Außendurchmesser dem Innendurchmesser der Rheometerkammer angepaßt ist, wobei der zylindrische Rotor an der, der Quarzplatte zugewandten Seite kegelförmig ausgebildet ist und die Quarzplatte mit der in der Drehachse des Rotors liegenden Kegelspitze berührt; und

35

die eine Zuleitung und eine Ableitung für die Pufferlösung in die aus Rheometerkammerinnenwänden, Rotorkegel und lichtdurchlässiger Quarzplatte gebildeter Probenkammer, aufweist; und ein Motor zum Antrieb des Rotors vorgesehen ist.

12. Analysator nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuleitung und die Ableitung der Probenlösung im wesentlichen diametral zur Rotordrehachse angeordnet sind.

5 13. Analysator nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuleitung und die Ableitung in der lichtdurchlässigen Quarzplatte angeordnet sind.

10 14. Analysator nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuleitung nahe der Drehachse des Rotors und die Ableitung am Außenrand der Probenkammer in einer Linie mit der Drehachse des Rotors auf der lichtdurchlässigen Quarzplatte angeordnet sind.

15 15. Analysator nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die verschließbare Injektionsöffnung zum Einbringen einer Probenlösung in die Probenkammer in der Zuleitung angeordnet ist.

20 16. Analysator nach einem der Ansprüche 11-15, dadurch gekennzeichnet, daß der Winkel zwischen Rotorachse und Tangentiale an der Kegelmantelfläche  $85-89.9^\circ$  beträgt.

25 17. Analysator nach einem der Ansprüche 11-16, dadurch gekennzeichnet, daß weitere Mittel zur Erzeugung extrem dünner Flüssigkeitsschichten in Form einer zuleitungsseitig angeordneten Vorrichtung vorgesehen sind, wobei diese Vorrichtung den Volumenstrom der Pufferlösung in der Zuleitung durch Einbringen von Volumeneinheiten aus einem mit der Pufferlösung nicht mischbaren Fluid in Volumenstromsegmente unterteilt.

30 35 18. Analysator nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das mit der Pufferlösung nicht mischbare Fluid aus Gas oder einer mit der Pufferlösung nicht mischbaren Flüssigkeit besteht.

19. Verfahren zur Analyse einer Flüssigkeit auf einen in der Flüssigkeit vorhandenen Inhaltsstoff in einer Probenanalysekammer, dadurch gekennzeichnet, daß man den durch die Probenanalysekammer zu leitenden Flüssigkeitsstrom in der 5 Zuführung vor Eintritt in die Probenanalysekammer durch ein mit der Flüssigkeit nicht mischbares Fluid in Volumenstromsegmente unterteilt, anschließend die segmentierten Volumenstromsegmente in die Probenanalysekammer leitet und dann die 10 Volumenstromsegmente in der Analysekammer auf den Inhaltsstoff untersucht.

15 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das mit der Pufferlösung nicht mischbare Fluid aus Gas oder einer mit der Pufferlösung nicht mischbaren Flüssigkeit besteht.

25 21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß man den Flüssigkeitsstrom über ein Zweiwegeventil mit je einer Zuführung für den Flüssigkeitsstrom und das mit der Pufferlösung nicht mischbare Fluid und einer gemeinsamen Abführung in Richtung der Probenanalysenkammer leitet, wobei während der Analyse des Flüssigkeitsstromes in der Probenanalysenkammer in Intervallen zwischen den beiden Zuführungspositionen am Zweiwegeventil intermittierend geschaltet wird.

30 35 22. Verfahren zur Bestimmung der Adsorptionskonstanten von Proteinen an Oberflächen unter Verwendung des Analysators nach einem der Ansprüche 1 bis 18, das die folgenden Schritte umfaßt:

Durchleiten einer Pufferlösung durch die Probenkammer im Analysator;

Einbringen der zu untersuchenden Probenlösung über die Injektionsöffnung in die Probenkammer;

Beaufschlagen des optischen Prismas mit monochromatischem Licht in einem kritischen Winkel von etwa 70°, Messen der Lichtintensität des an der Grenzschicht zwischen

Quarzplatte und Probenkammer erzeugten und im wesentlichen lotrecht zur Quarzplatte aus- und in den Emissionsmonochromator eintretenden Fluoreszenzlichtes;

5 23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß vor Einbringen der Probenlösung in die Probenkammer ein nicht mit der Probenlösung mischbares Fluid von maximal 1000 µl in die Zuleitung eingebracht wird.

10 24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Fluid in Form einer Luftblase in die Probenkammer eingebracht wird.

Fig. 1

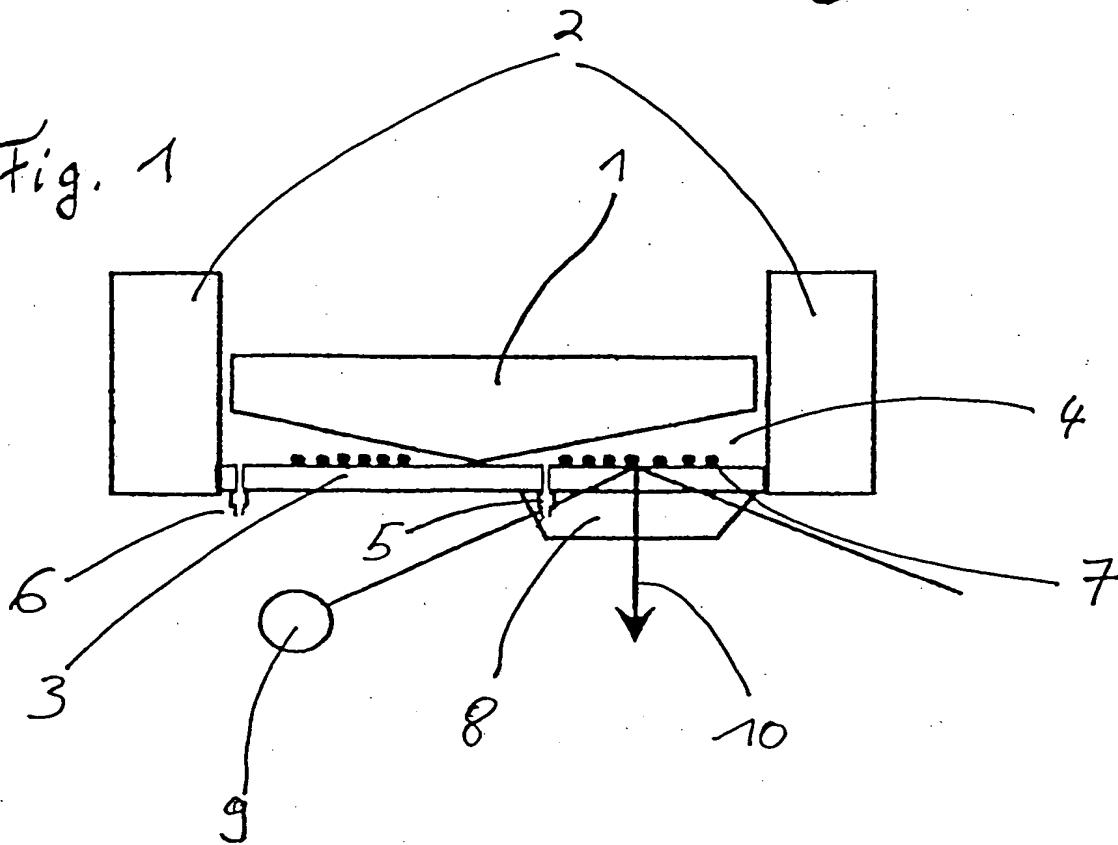


Fig. 2

